

KARAKTERISTIKE KRVNIH ČELIJA *Sabanejewia balcanica* (Cobitidae) IZ NEKIH TEKUĆICA SLIVNOG PODRUČJA RIJEKE SAVE

*Alen Bajrić¹, Avdul Adrović¹, Edina Hajdarević¹, Isat Skenderović¹,
Eldar Tanović², Goran Marković³*

Izvod: Ovo istraživanje obuhvatilo je analizu morfoloških karakteristika krvnih čelija, kao i diferencijalnu krvnu sliku balkanskog zlatnog vijuna (*Sabanejewia balcanica*) sa osam lokaliteta slivnog područja rijeke Save. Analizirano je 39 krvnih razmaza jedinki prikupljenih iz rijeke Turije, Gostelje, Oskove, Brke, Suturlije, Suhe, Tinje i Trebačke. Preparati su bojeni metodom po *Pappenheim*-u i mikroskopirani pod imerzionim objektivom. Hematološke karakteristike ove vrste su nedovoljno proučene, tako da sprovedeno istraživanje može poslužiti kao osnova za dalja i kompleksnija hematološka istraživanja. Istraživana vrsta je u mnogim zemljama opisana kao osjetljiva ili ugrožena vrsta. Zbog toga je potrebno je utvrditi i sačuvati njena prirodna staništa i upoznati njihove ekološke karakteristike čiji efekti se svakako mogu konstatovati proučavanjem njihovog hematološkog statusa.

Gljučne reči: *Sabanejewia*, krv, čelija, leukociti, Sava

Uvod

Hematološke karakteristike riba predstavljaju važan parametar u proučavanju njihovih fizioloških osobina (Hrubec i sar., 2001; Ivanc i Miljanović, 2003). Ovi parametri stoje u uskoj povezanosti sa uslovima životne sredine koji na njih ostavljaju veliki uticaj (Gabriel i sar., 2004). Iz navedenog razloga hematološki karakteri se koriste za praćenje odgovora riba na stres, te za utvrđivanje njihovog zdravstvenog stanja u nepovoljnim uslovima životne sredine.

Balkanski zlatni vijun (*Sabanejewia balcanica*) je vrsta iz familije Cobitidae koja nastanjuje gornje do srednje dijelove manjih tekućica, sa kamenitim i šljunkovitim dnom (Kottelat and Freyhof, 2007). Ova vrsta je zaštićena Bernskom konvencijom i Evropskom direktivom o zaštiti staništa. U projektu izrade crvene liste faune Bosne i Hercegovine konstatovano je da je *Sabanejewia balcanica* osjetljiva vrsta (VU) ali i da nema dovoljno podataka o populacionim karakteristikama ove vrste da bi se odredio stepen njene ugroženosti. O njenim hematološkim karakteristikama vrlo malo se zna. Pregledom dostupnih literaturnih podatka nije utvrđen niti jedan rad koji se bavi hematologijom ispitivane vrste. Cilj ovog rada je upoznavanje sa osnovnim morfološkim oblicima krvnih čelija ove vrste i procentualnom zastupljenošću pojedinih formi leukocita sa osam različitih lokaliteta slivnog područja rijeke Save.

¹Univerzitet u Tuzli, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitetska 4, 75000 Tuzla, BiH (alen.bajric@untz.ba);

²JP Elektroprivreda BiH d.d. Sarajevo, ZD Rudnici „Kreka“ d.o.o. Tuzla, Pogon rekultivacija Šićki Brod, Mije Keroševića Guje br. 1, 75000 Tuzla, BiH.

³Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak Srbija.

Materijal i metode rada

Za potrebe istraživanja napravljeni su krvni razmazi 39 jedinki izlovljenih iz 8 različitih tekućica slivnog područja rijeke Save: Turija, Gostelja, Oskova, Brka, Suturlija, Suha, Tinja i Trebačka (Slika 1).



Slika 1. Karta sjevernog dijela Bosne i Hercegovine sa istraživanim lokalitetima (Google maps)

Figure 2. Map of north Bosnia and Hercegovina with sampling localities (Google maps)

Jedinke su prikupljene elektroribolovom. Obzirom da je riječ o ribama malih dimenzija, zapremina krvi u njihovom tijelu je izuzetno mala, uzimanje krvi je izvršeno punkcijom srca skraćenim iglama promjera 0,8 mm. Napravljeni razmazi krvi bojeni su metodom po *Pappenheimu*. Identifikacija pojedinih formi leukocita, i krvnih ćelija uopšteno utvrđena je mikroskopiranjem pod imerzionim objektivom. Nakon uzimanja krvi, jedinke su uspavane korištenjem anestetika MS-222 te pohranjene u 4 % formaldehidu. Statistička obrada dobijenih podataka urađena je primjenom softvera Microsoft Office Excel 2007 i Statistica 10.

Rezultati istraživanja i diskusija

Najbrojnije ćelije u krvnom razmazu balkanskog zlatnog vijuna su eritrociti. Najčešće su elipsoidnog oblika, sa jasno izraženim jedrom čiji oblik prati oblik stanice. Citoplazma eritrocita pokazuje eozinofilnu obojenost (Slika 2). Osim zrelih eritrocita, na preparatima su se uočavale i njihove razvojne forme.

Trombociti su dosta mali i pokazuju različite forme i oblike, tako da ih ima vretenastih, okruglih, ovalnih ili u obliku kapi. Njihova citoplazma skoro da je bezbojna, a samo jedro izgleda dosta homogeno (Slika 3). Trombociti balkanskog zlatnog vijuna izgledom mogu da podsjećaju na limfocite približnih veličina tako da se

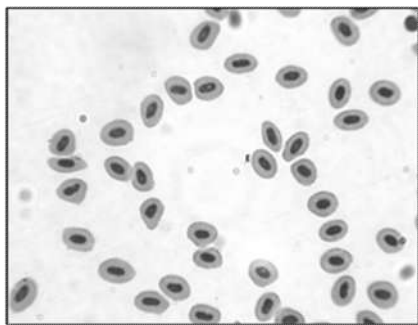
vrlo često mogu napraviti greške u utvrđivanju leukocitne formule, a kao najbolji način razlikovanja je bazofilno obojena citoplazma limfocita.

Limfociti mogu da budu različitih veličina, pri čemu najveći dio ćelije zauzima ovalno jedro (Slika 4). Citoplazma je smještena uz sam rub ćelije i izrazito bazofilna. Veličina i oblik leukocita zavisi od stepena njihove aktivacije i razvoja.

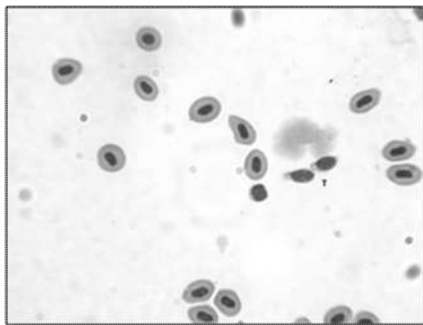
Monociti balkanskog zlatnog vijuna su najkrupniji leukociti u krvnom razmazu. Jedro može biti okruglo, ovalno ili lobularno. Citoplazma je obilna, bazofilno obojena i najčešće ispunjena brojnim vakuolama (Slika 5).

Neutrofilni granulociti zastupljeni su sa dvije forme, sa nesegmentiranom ili segmentiranom jezgrom (Slika 6 i 7). Njihova citoplazma slabo je obojena i u njoj postoje granulacije koje nemaju afinitet prema bojama. Nesegmentirani neutrofilni granulociti ove vrste imaju ovalno do okruglo jedro, pa se u literaturi još nazivaju i kao okrugli neutrofili (*eng. round*). Segmentirani neutrofilni granulociti imaju segmentirano jedro, čija segmentacija može da bude različita.

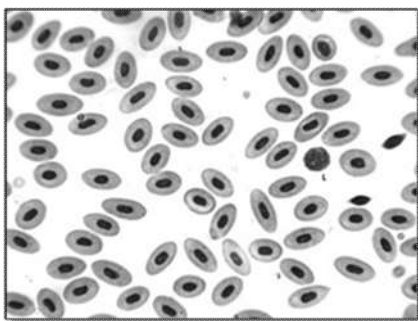
Bazofilni granulociti karakteristični su po prisustvu bazofilnih granula u citoplazmi, koje najčešće prekrivaju kompletno jedro tako da je teško utvrditi njegov oblik (Slika 8). Eozinofilne granulocite nismo utvrdili u analiziranim krvnim razmazima.



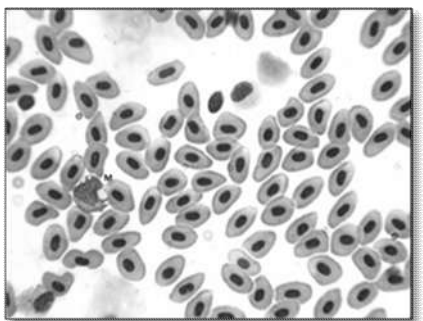
Slika 2. Eritrociti
Figure 2. Erythrocytes



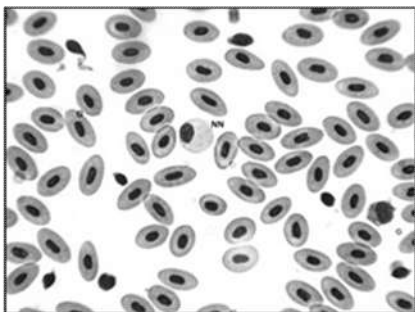
Slika 3. Trombociti
Figure 3 Trombocytes



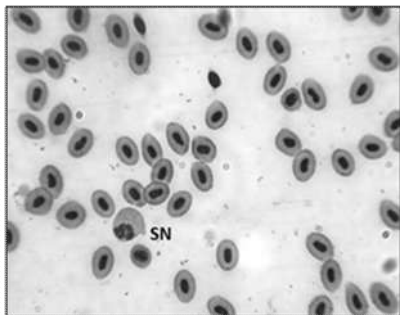
Slika 4. Limfocit
Figure 4. Lymphocyte



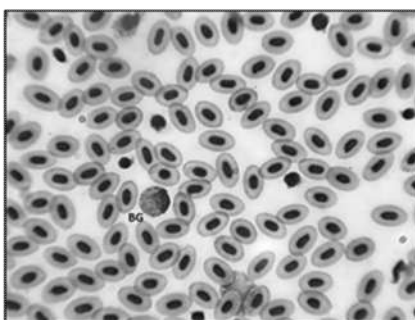
Slika 5. Monocit
Figure 5. Monocyte



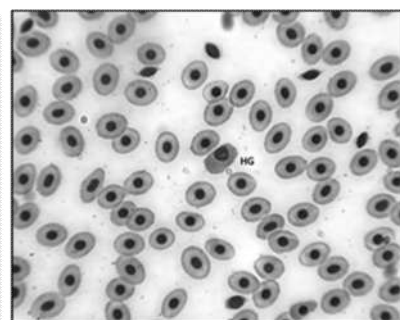
Slika 6. Nesegmentirani neutrofil
Figure 6. Unsegmented neutrophils



Slika 7. Segmentirani neutrofil
Figure 7. Segmented neutrophil



Slika 8. Bazofilni granulocit
Figure 8. Basophilic granulocyte



Slika 9. Heterofil
Figure 9. Heterophil

Najveću zastupljenost u leukocitnoj formuli analiziranih jedinki imali su limfociti (53,96 %), zatim slijede nesegmentirani neutrofil (30,15 %), monociti (8,26 %), segmentirani neutrofil (4,77 %), heterofili (2,24%) i bazofilni granulociti (0,47 %), dok eozinofilne granulocite nismo konstatovali. Njihova zastupljenost po lokalitetima odnosno populacijama predstavljena je tabelarno (Tabela 1).

Analiza varijanse (ANOVA) je pokazala da za najveći broj leukocita ne postoje statistički značajne razlike između analiziranih populacija ($P > 0,05$). Statistički značajne razlike utvrđene su u broju nesegmentiranih neutrofila ($F_{7,31}=2,98$ $P < 0,05$) i limfocita ($F_{7,31}=2,54$ $P < 0,05$).

Literaturne podatke o hematološkim istraživanjima *Sabanejewia balcanica* nismo pronašli, što ukazuje na značaj dobijenih rezultata ali i na problematiku daljnjih proučavanja ove vrste. Na različite vrijednosti diferencijalne krvne slike kod riba utiču različiti abiotički i biotički faktori. Ovdje prvenstveno mislimo na fkarakteristike i kvalitet vode. Različite vrijednosti diferencijalne krvne slike mogu da imaju individualan karakter jer zavise od zdravstvenog stanja organizma.

Tabela 1. Leukocitna formula populacija *Sabanejewia balcanica*

Table 1. *Leucocytes of population Sabanejewia balcanica*

Leukocit/Lok. <i>Leucocytes/Loc.</i>	Turija	Gostelja	Oskova	Brka	Suturlija	Suha	Tinja	Trebačka
Seg. neutrofil <i>Seg. neutrophiles</i>	5,4	7,8	8,1	2	4	7,3	2	1,6
Neseg. neutrofil <i>Unseg. neutrophiles</i>	23,4	40	36,3	19,2	12	29	43	38,3
Heterofil <i>Heterophiles</i>	1,6	2	3,5	2,5	1,3	1,1	2,4	3
Eozinofil <i>Eozinophiles</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Bazofil <i>Bazophiles</i>	0,6	0,8	0,5	0,3	0	0,8	0,2	0,8
Monocit <i>Monocytes</i>	7,4	6,3	7,1	8,8	13,3	11,3	7,2	4,5
Limfocit <i>Lymphocytes</i>	61,6	43	44,3	67	69,3	50,3	45	51,5
Ukupno: <i>Total:</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Kod sedam populacija utvrđen je povišen broj neutrofila u odnosu na literaturne podatke o njihovoj zastupljenosti kod riba u normalnim uslovima života (Bogut i sar., 2006.). Visoke vrijednosti neutrofila u krvi riba ukazuju na neku bakterijsku infekciju, odnosno bolesno stanje. Obzirom da nema literaturnih podataka o hematologiji istraživane vrste nije bilo moguće uporediti naše rezultate. Potrebno je provesti detaljnija hematološka istraživanja po sezonama, uz praćenje više ekoloških faktora.

Leukocitna formula *Silurus glanis* pokazala je da su limfociti činili najveći dio leukocita, zatim neutrofil i monociti. Od granulocita dominantni su bili neutrofil, rjeđi su bili bazofili dok eozinofilnih granulocita nije bilo nikako (Docan i sar., 2015).

Hematološka istraživanja vršena su i na vrsti *Leucaspis delineatus* (Homatovska i sar., 2002), gdje je konstatovano da su od agranulocita bili najbrojniji limfociti (20,9 %), a od granulocita štapićasti neutrofil. U navedenom istraživanju ukazano je i na procentualnu zastupljenost pojedinih razvojnih stadija leukocita, pri čemu su od njihovih konačnih formi najmanju zastupljenost imali bazofili (0,77 %).

Modrá i sar. (1998) istraživali su procentualnu zastupljenost leukocita u krvi četiri ekonomski važne vrste (*Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*, *Silurus glanis* i *Onorhynchus mykiss*) i četiri indikatorske vrste (*Abramis brama*, *Perca fluviatilis*, *Leuciscus cephalus*, *Salmo trutta m.fario*) u nezagađenim uslovima i periodu vegetacijske sezone. Utvrđen je visok procenat limfocita i to najviše kod grgeča (99,1 %), monociti su bili sporadični i najzastupljeniji kod soma (1,42 %). Visoke vrijednosti granulocitnih limfocita utvrđene su kod kalifornijske i jezerske pastrmke, od kojih su bili najdominantniji neutrofil.

Istraživanje hematoloških karakteristika deverike iz hidroakumulacije Modrac ukazuje takođe da su limfociti bili najviše zastupljeni u njihovoj diferencijalnoj krvnoj

slici (70,49 %), zatim slijede nesegmentirani neutrofili (12,68 %), heterofili (9,16 %), monociti (5,15 %), segmentirani neutrofili (2,12 %), eozonofilni granulociti (0,33 %) te bazofilni granulociti (0,04 %) (Hajdarević, 2011).

Diferencijalna krvna slika kod jedinki *Stizostedion lucioperca* i *Perca fluviatilis* iz rijeke Tise, pokazala je da su najzastupljeniji neutrofilni granulociti, zatim limfociti, monociti, segmentirani neutrofili te pseudoeozinofili (Ivanc i sar., 1994).

Zaključak

Provedenim istraživanjem populacija *Sabanejewia balcaanica* su prvi put je u Bosni i Hercegovini ali i na širem području proučavana hematološke karakteristike ove ugrožene vrste. Na ovaj način je ukazano na osnovne morfološke oblike krvnih ćelija, kao i na diferencijalnu krvnu sliku unutar koje su bili najzastupljeniji limfociti, zatim neutrofilni granulociti, monociti i bazofili.

Literatura

- Bogut I., Novoselić D., Pavličević J. (2006). Biologija riba. Sveučilište J. J. Strossmayera Osijek, Sveučilište u Mostaru.
- Docan A., Cristea V., Dediu L., Grecu L. (2015). Studies Of European Catfish (*Silurus Glanis* L.) Leukocytes Reaction In The Condition Of Rearing In "Flow-Through" Aquaculture systems. *Lucrări Științifice - vol. 53, Seria Zootehnie*.
- Gabriel U. U., Ezeri G. N. O., Opabunmi O. O. (2004). Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). *African Journal of Biotechnology* 3:463–467.
- Hajdarević E. (2011). Hematološke karakteristike deverike *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) iz hidroakumulacije modrac u sezonskom aspektu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Sarajevu. Prirodno-matematički fakultet. Sarajevo.
- Homatowska A., Wojtaszek J., Adamowicz A. (2002). Haematological Indices And Circulating Blood Picture In The Sunbleak, *Leuciscus Deloneatus* (Heckel, 1843). *Zoologica Poloniae*, 47(3-4), 57-68.
- Hrubec T. C., Smith S. A., Robertson J. L. (2001): Age related in haematology and chemistry values of hybrid striped bass *Chrysops Morone saxatilis*. *Veterinary Clinical Pathology*, 30(1), 8–15.
- Ivanc A., Miljanović, B. (2003). Hidroakumulacije, Multidisciplinarni pristup održivom razvoju. Monografija, Prirodno-matematički fakultet Novi Sad, Ministarstvo za zaštitu prirodnih bogatstava i životne sredine, Zavod za zaštitu zdravlja "Timok" Zaječar, JVP "Vode Srbije", JVP "Vode Vojvodine." Novi Sad.
- Ivanc A., Maletin S., Djukić N., Miljanović B. (1994). Ecophysiological interpretation of hematology of different Percidae species in the river Tisza. *Tiscia*, 28, 53-56.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007). Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat. Cornol, Switzerland. Freyhof. Berlin, Germany.
- Modrá H., Svobodová Z., Kolářová J. (1998). Comparison Of Differential Leukocyte Counts In Fish Of Economic And Indicator Importance. *Acta Vet. Brno*, 67, 215-226.

THE CHARACTERISTICS OF THE BLOOD CELLS OF *Sabanejewia balcanica* (Cobitidae) FROM SOME RIVERS IN THE WATER CATCHMENT AREA OF THE RIVER SAVA

Alen Bajrić¹, Avdul Adrović¹, Edina Hajdarević¹, Isat Skenderović¹, Eldar Tanović², Goran Marković³

Abstract

The research deals with the analysis of the morphological characteristics of the blood cells and the differential leucocytes count in the Balkan spined loach (*Sabanejewia balcanica*) from eight locations of the Sava River. In the study, 39 blood smears of individuals collected from the Turija, Gostelja, Oskova, Brka, Suturlija, Suha, Tinja and Trebačka Rivers were analyzed. The blood smears were stained by the Pappenheim method and were analyzed at the magnification 100x. The information on the hematological characteristics of this species is scarce. Thus, this research will serve as a basis for further and more complicated hematological researches. Taking into account the fact that in many countries the investigated species is described as a sensitive or endangered species, it is necessary to establish and preserve its natural habitats and to know their ecological characteristics whose effects can be determined by studying their hematological status.

Key words: *Sabanejewia*, blood, cells, leucocytes, Sava

¹University of Tuzla, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Univerzitetska 4., 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina (alen.bajric@untz.ba)

²JP Elektroprivreda BiH d.d. Sarajevo, ZD Rudnici „Kreka“ d.o.o. Pogon Rekultivacija Šićki Brod, Mije Keroševića Guje br.1, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

³University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia